

缺氧对培养的人视网膜色素上皮细胞中 NOX4 表达的影响

李 静¹, 杨 静², 康前雁²

基金项目:陕西省自然科学基金项目(No. 2014JM2-8190)

作者单位:¹(710068) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科;²(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介:李静, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士, 副主任医师, 研究方向:脉络膜新生血管发病机制。

通讯作者:康前雁, 博士, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向:青光眼、眼底病. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期:2016-08-15 修回日期:2016-12-02

Effect of hypoxia on expression of NOX4 in human retinal pigment epithelium

Jing Li¹, Jing Yang², Qian-Yan Kang²

Foundation item: Natural Science Foundation of Shaanxi (No. 2014JM2-8190)

¹Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qian - Yan Kang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

Received:2016-08-15 Accepted:2016-12-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of hypoxia on the expression of NOX4 in cultured human RPE cells *in vitro*.

• **METHODS:** Human RPE cells were cultured and passaged, and 3-6 generation cells were used in the experiment. The experiment was divided into normoxia control group and hypoxia group. The human RPE cells in normoxia control group were routinely cultured. The culture medium containing 200 μmol/L CoCl₂ was used to establish the hypoxia model of human RPE cells cultured *in vitro* for 0, 4, 6, 8, 12 and 24h, and the RPE cells cultured normoxia were as controls. The effects of different time of hypoxia on the expression of NOX4 were identified by Immunofluorescence staining and Western-blot assay.

• **RESULTS:** RPE cells grew well in the control group and hypoxia group. The morphology was spindle. The morphology and arrangement of cells in hypoxia group had no significant change compared with the control group. Immunofluorescence staining showed that there was a small amount of NOX4 expression in the RPE cells of the normoxia control group. Cytoplasm showed green

fluorescence while the nucleus was blue. The expression of NOX4 increased after hypoxia, and continued until the late stage of hypoxia. Western-bolt results showed that the expression level of NOX4 under hypoxic conditions in RPE cells increased significantly, and is proportional to the hypoxia time, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** NADPH oxidase 4 in normal human RPE cells have a small amount of expression, hypoxia can significantly increase the expression of NOX4, and is proportional to the time. It suggests that NADPH oxidase may play an important role in the formation of choroidal neovascularization.

• **KEYWORDS:** human retinal pigment epithelium; NADPH oxidase 4; choroidal neovascularization

Citation: Li J, Yang J, Kang QY. Effect of hypoxia on expression of NOX4 in human retinal pigment epithelium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(1):34-37

摘要

目的: 观察缺氧对培养的人视网膜色素上皮细胞中 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 表达的影响, 探讨 NADPH 氧化酶与脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成的关系。

方法: 人视网膜色素上皮细胞 (human retinal pigment epithelium, hRPE) 体外常规培养和传代, 取 3 ~ 6 代细胞用于实验。将培养的人 RPE 细胞分为常氧对照组和缺氧处理组, 常氧对照组用 DMEM 完全培养液培养细胞, 缺氧处理组培养液中含有终质量浓度为 200 μmol/L CoCl₂, 分别观察缺氧后 4、6、8、12、24h 后终止。采用细胞免疫荧光染色技术及 Western-blot 方法鉴定人 RPE 细胞中 NOX4 的表达以及缺氧不同时间对 NOX4 表达的影响。

结果: 常氧对照组及缺氧处理组人 RPE 细胞生长良好, 形态呈梭形。缺氧处理组细胞的形态及排列方式与空白对照组相比无明显改变。免疫荧光染色显示, 常氧对照组 RPE 细胞内有少量的 NOX4 表达, 细胞质呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光; 缺氧处理后 NOX4 的表达量增加, 一直持续到缺氧后期; Western-bolt 显示缺氧条件下人 RPE 细胞中 NOX4 的表达明显增加, 与缺氧时间呈正比, 与常氧对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);

结论: NADPH 氧化酶在人 RPE 细胞中有表达, 缺氧条件下 NOX4 的表达显著提高, 且与时间呈正比。提示 NADPH 氧化酶可能在脉络膜新生血管形成中发挥重要调节作用。

关键词: 人视网膜色素上皮细胞; NADPH 氧化酶 4; 脉络膜新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.1.08

引用:李静,杨静,康前雁.缺氧对培养的人视网膜色素上皮细胞中 NOX4 表达的影响.国际眼科杂志 2017;17(1):34-37

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、病理性近视、糖尿病视网膜病变等40余种致盲性眼病共同的病理基础^[1],其发生机制不完全清楚。现已公认缺氧引起的血管生成因子和抑制因子的失衡,同时引发的一系列细胞、细胞外基质生物学效应的改变是诱发该类疾病的关键^[2],烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NADPH)是体内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的主要来源,ROS水平直接反映了细胞内氧化应激的程度^[3-4]。NADPH氧化酶4(NOX4)是NADPH氧化酶家族(NOX家族)重要亚型之一^[5]。研究表明,NOX4通过激活H₂O₂/VEGFR2/ERK信号通路而促进视网膜新生血管的形成,与糖尿病视网膜病变的发生密切相关^[6],正常情况下RPE细胞可表达NOX4^[7-8],那么缺氧是否能诱导NOX4高表达,是否有参与脉络膜新生血管的发生尚未见报道。本实验通过观察缺氧不同时间RPE细胞中NOX4的表达情况,探讨NADPH氧化酶与CNV发生的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 ARPE-19细胞系(ATCC; Manassas VA)。DMEM培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 杭州四季青公司);分析纯二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 美国Sigma公司);NOX4鼠抗人多克隆抗体一抗(英国Abcam公司);抗β-actin鼠抗人多克隆抗体(英国Abcam公司);二抗羊抗鼠多克隆抗体IgG-HRP(ab6721, 英国Abcam公司)、CoCl₂(美国Sigma公司)。倒置相差显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 人RPE的培养 用含体积分数10% FBS的DMEM培养液于CO₂恒温培养箱中培养RPE,细胞融合至80%时进行传代培养。传代后每24h更换培养液,3~4d细胞传代1次,取3~6代细胞用于实验。

1.2.2 CoCl₂溶液的制备及分组 将培养基配制成分终浓度含有200μmol/L CoCl₂备用。将人RPE细胞调整密度为5×10⁷个/μL,接种于24孔板中,置于细胞培养箱内静置培养24h后分组:常氧对照组正常培养,缺氧组换液时换以含终浓度为200μmol/L CoCl₂的培养基建立化学缺氧模型^[8]。于加药导致缺氧后4、6、8、12、24h共5个时间点终止缺氧。

1.2.3 细胞免疫荧光染色检测和定位人RPE中NOX4的表达 收集生长良好的细胞,经2.5g/L胰蛋白酶消化后制备成细胞悬液,调整细胞密度为5×10³个/μL,接种于96孔板中,待细胞充分贴壁;常氧对照组用DMEM完全培养液培养RPE,缺氧组加以含终浓度为200μmol/L CoCl₂的培养基,置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中进行培养。分别培养0、4、6、8、12、24h后弃去培养液,用PBS冲洗细胞3次,每孔加入100μL预冷甲醇,置于-20℃冰箱中固定30min。向每个培养孔中加入体积分数

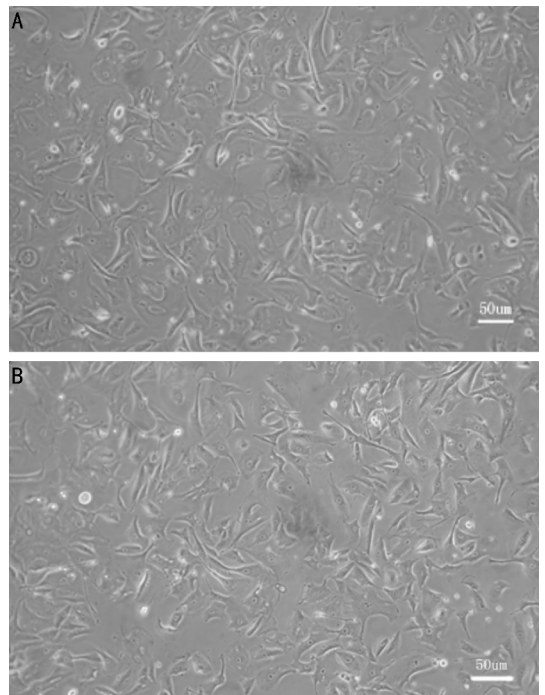


图1 培养hRPE细胞的形态(可见细胞呈梭形或不规则形,细胞体积变大,×200) A:常氧对照组;B:缺氧处理组。

0.1% Triton X-100溶液,室温下放置30min进行破膜处理,再用PBS冲洗细胞3次,每孔加入1% BSA溶液100μL,孵育1h;加入相应一抗4℃孵育过夜,PBS冲洗细胞3次,加入相应二抗室温下避光孵育40min,PBS冲洗细胞3次,每孔加入10μg/mL DAPI溶液100μL,室温下避光孵育5min。吸去DAPI溶液,PBS冲洗细胞3次,倒置荧光显微镜下观察,利用NIS-Elements D 3.2显微照相系统进行拍照。

1.2.4 Western-blot法检测缺氧对人RPE细胞中NOX4蛋白表达的影响 以含10% FBS的DMEM培养液培养RPE,贴壁生长48h后,PBS清洗,常氧对照组和缺氧处理组的培养方法同1.2.3。收集细胞后,RIPA裂解液法常规提取细胞总蛋白,BCA法测定细胞总蛋白的质量浓度,配制SDS-PAGE凝胶,Marker上样量为5μL,蛋白样品上样量为每孔25μL,其余各孔均用1×loading buffer补足至25μL。设置初始电压90V,待溴酚蓝指示剂移至浓缩胶与分离胶交界处时,调整电压为120V,待溴酚蓝指示剂到达分离胶下缘时,终止电泳。转膜(硝酸纤维素膜),质量分数5%脱脂奶粉的TBST液封闭,加入鼠抗人NOX4抗体(1:1000)或β-actin抗体(1:20000),4℃孵育过夜;洗膜,加入相应的羊抗鼠二抗(1:100000)室温下孵育1h;利用凝胶图像分析软件Quantity One分析特异条带灰度值进行分析。实验重复3次,以β-actin为内参,蛋白表达强度以各组条带灰度值与β-actin条带灰度值的比值表示。

统计学分析:采用SPSS 18.0统计学软件进行统计学分析,本研究中测量指标的数据资料,经W检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间NOX4相对表达量的差异比较采用单因素方差分析。组间多重比较采用Dunnnett-t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养hRPE的形态学观察 hRPE正常状态下呈多

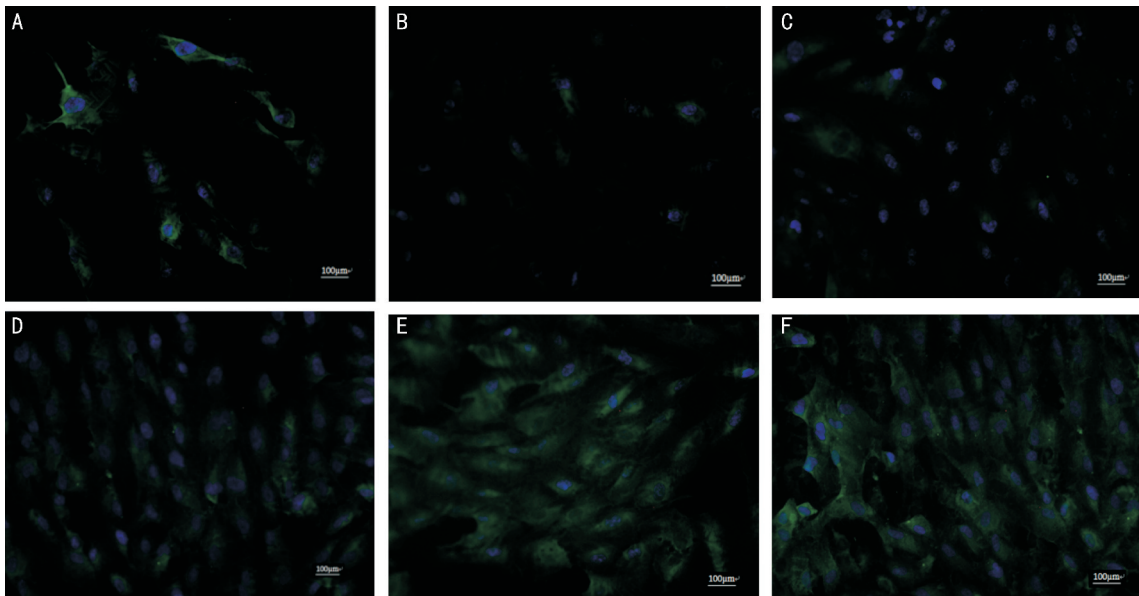


图2 各组细胞 NOX4 免疫荧光染色(常氧对照组可见 NOX4 少量表达在细胞质中,绿色荧光;4~6h 缺氧处理组可见 NOX4 表达开始增加;8~12h 缺氧处理组可见 NOX4 表达量显著增加;缺氧 24h 处理组可见 NOX4 高表达量一直持续; $\times 400$) A:常氧对照组; B:缺氧 4h;C:缺氧 6h;D:缺氧 8h;E:缺氧 12h;F:缺氧 24h。

边形,贴壁生长,由于在体外培养过程中不能产生黑色素,所以随着传代次数的增加,胞浆内的黑色素颗粒逐渐减少。细胞传至第 3 代时色素颗粒明显减少,而传至第 4 代基本消失。传代细胞形态与原代细胞相比呈梭形或不规则形,细胞体积变大,细胞核仍呈圆形或椭圆形。常氧对照组 hRPE 呈长梭形,细胞核位于细胞的中部,细胞质丰富,缺氧处理组细胞的形态及排列方式与空白对照组相比无明显改变(图 1)。

2.2 各组 hRPE 中 NOX4 的表达定位 细胞免疫荧光染色结果显示,常氧对照组 RPE 细胞内有少量的 NOX4 表达,细胞质呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光(图 2A),而缺氧处理后 NOX4 的表达量增加,一直持续到缺氧后期(图 2B~F)。

2.3 Western-blot 法检测缺氧对 hRPE 中 NOX4 蛋白表达的影响 Western-blot 法检测缺氧对 hRPE 中 NOX4 蛋白表达影响,结果显示,常氧处理组 NOX4 有少量的表达,缺氧处理组培养 4、6、8、12、24h 后 NOX4 的蛋白相对表达量明显上升,即缺氧可上调 NOX4 的蛋白表达,表达量的增高与缺氧时间呈正比(图 3,4)。

3 讨论

脉络膜新生血管根本原因为血管生成刺激因子的相对或绝对增多,其原因目前大家公认的是缺氧学说。该学说认为损伤和炎症反应等引起局部组织缺氧,导致局部释放多种促新生血管生成因子,在这些细胞因子的共同作用下,导致异常增生的脉络膜血管突破 Bruch 膜向 RPE 下或神经上皮生长,引起黄斑区的反复出血形成黄斑区瘢痕,最终导致视力的永久性丧失^[9]。

研究表明,氧化应激在脉络膜新生血管病变中起关键作用^[10]。氧化应激可以诱导线粒体通路及 NADPH 氧化酶途径产生过量的超氧化物(ROS)致其功能损害。ROS 是指一类由氧形成的、化学性质较基态氧活泼的氧自由基和非自由基的含氧代谢物质。ROS 在体内具有双向调节作用,正常情况下,ROS 生成对于机体防御功能是必要的;但在某些病理情况下,体内 ROS 大大增加,同时机体抗氧化



图3 Western blot 检测缺氧时 hRPE NOX4 蛋白条带情况。

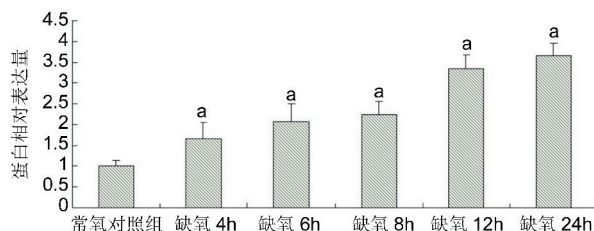


图4 Western-blot 检测缺氧对 hRPE NOX4 蛋白表达的影响 ^a $P < 0.05$ vs 常氧对照组。

化防御能力下降,氧化能力超过抗氧化能力而发生氧化应激,从而引起 ROS 对生物体脂质、蛋白质和核酸染色体的直接损伤,导致细胞的凋亡或死亡^[11]。ROS 还可通过活化 NF- κ B 上调 HIF1- α 的 mRNA 转录,使血管生成因子 VEGF 高表达,从而促进新生血管的形成^[12]。

NOX4 是 NADPH 氧化酶家族重要成员之一,它是血管内皮细胞产生 ROS 的主要来源,是氧化应激 NADPH-ROS 途径一个重要的组成部分,NADPH 氧化酶的唯一功能就是催化 ROS 的产生,同时参与了纤维化、炎症和肿瘤的形成^[13-14]。Gu 等^[15]研究发现,NOX4 在角膜碱烧伤后参与了角膜新生血管的形成。Vallet 等^[16]报道在缺血诱导的小鼠脑新生血管中 NOX4 表达上调,我国李晶明等学者发现 NOX4 在糖尿病大鼠模型中的视网膜组织及视网膜血管内皮细胞中高表达^[6],并显著上调 H_2O_2 诱导的 VEGFR2/ERK 信号通路高表达,促进了视网膜新生血管

的生成,正常的视网膜色素上皮细胞可表达 NOX4,但缺氧条件下,NOX4 的表达是否增加,NOX4 的表达增加是否能促进脉络膜新生血管的发生尚未见报道。

本实验采用 CoCl₂ 模拟细胞缺氧环境,使用免疫荧光实验及 Western-blot 对缺氧在人 RPE 细胞 NOX4 的表达进行了研究,结果显示:人 RPE 细胞表达 NOX4,定位在细胞质中,缺氧能明显上调 NOX4 的表达,NOX4 的表达与缺氧时间的延长呈正比。分析其可能的作用机制之一是:由于 NOX4 为血管内皮细胞中 ROS 产生的主要来源,在缺氧状态下,VEGF 表达主要受转录因子缺氧诱导因子(HIF1)的调节,而 HIF1- α 启动子处含有 NF- κ B 结合位点,ROS 活化 NF- κ B 上调 HIF1,促进 VEGF 的表达。VEGF 高表达导致血管内皮功能障碍,渗漏增加,促进新生血管形成。Chen 等^[17]报道给予 NADPH 氧化酶抑制剂或抗氧化剂可以缓解糖尿病动物视网膜的血管渗漏,根据我们的实验结果提示 NADPH 氧化酶可能在脉络膜新生血管形成中发挥重要调节作用。

CNV 发病机制复杂,治疗手段局限。实验虽已证实新生血管的发生与 VEGF 密切相关^[18],多个文献也已证实多种因子可通过多个信号通路上调 VEGFR 的表达,从而促进新生血管的发生^[19-20]。且临床上给予抗 VEGF 药物球内注射也有明显的临床效果,但是抑制 VEGF 及其受体,却无法完全抑制术后新生血管的再生及疾病的复发。本研究丰富了缺氧诱导的脉络膜新生血管形成的机制,可能为老年黄斑变性等脉络膜新生血管疾病的治疗提供新靶点和药物选择提供新思路。

本实验尚未进行动物实验,也未进行参与 ROS 氧化应激中调控 VEGFR 通路的 HIF1、上下游相关因子及各炎性因子的检测。NOX4 抑制剂对其影响也不得而知,这些都将在后续的实验中进行完善和进一步研究。

参考文献

- 1 Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res* 2015;49:67-81
- 2 Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, et al. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Mol Cell Oncol* 2015;2(4):e1024821
- 3 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87(1):245-313
- 4 Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012;60(4): 277-294

- 5 Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology* 2014;24(10):R453-462
- 6 Li J, Wang JJ, Zhang SX. NADPH oxidase 4-derived H₂O₂ promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy. *Diabetes Res* 2015;2015:963289
- 7 Qiu Y, Tao L, Lei C, et al. Downregulating p22phox ameliorates inflammatory response in Angiotensin II-induced oxidative stress by regulating MAPK and NF- κ B pathways in ARPE-19 cells. *Sci Rep* 2015;5:14362
- 8 Hollborn M, Reichmuth K, Prager P, et al. Osmotic induction of placental growth factor in retinal pigment epithelial cells *in vitro*: contribution of NFAT5 activity. *Mol Biol Rep* 2016;43(8):803-814
- 9 Kwak N, Okamoto N, Wood JM, et al. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3158-3164
- 10 Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:43603
- 11 Wang H, Han X, Wittchen ES, et al. TNF- α mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent β -catenin activation. *Mol Vis* 2016;22:116-128
- 12 BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, et al. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2007;42(4):446-459
- 13 Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. *Redox Biol* 2014; 2:267-272
- 14 Bonner MY, Arbiser JL. Targeting NADPH oxidases for the treatment of cancer and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:2435-2442
- 15 Gu XJ, Liu X, Chen YY, et al. Involvement of NADPH oxidases in alkali burn-induced corneal injury. *Int J Mol Med* 2016;38(1):75-82
- 16 Vallet P, Charnay Y, Steger K, et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 2005;132(2):233-238
- 17 Chen P, Guo AM, Edwards PA, et al. Role Of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(4):R1619-1629
- 18 Marneros AG. Increased VEGF-A promotes multiple distinct aging diseases of the eye through shared pathomechanisms. *EMBO Mol Med* 2016;8(3):208-231
- 19 Liu Q1, Li J, Cheng R, et al. Nitrosative stress plays an important role in Wnt pathway activation in diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(10):1141-1153
- 20 Li S, Huang L, Sun Y, et al. Slit2 Promotes Angiogenic Activity Via the Robo1-VEGFR2-ERK1/2 Pathway in Both *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(9):5210-5217